

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-281679

(P 2 0 0 0 - 2 8 1 6 7 9 A)

(43) 公開日 平成12年10月10日 (2000.10.10)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)	
C07D487/04	137	C07D487/04	137	4B024
A61P 35/00		A61K 31/00	635	4C050
A61K 31/407		31/40	609	4C086
31/4178		31/415	612	
// C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA	A
審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全10頁)				

(21) 出願番号 特願平11-83591

(22) 出願日 平成11年3月26日 (1999.3.26)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 杉山 弘

東京都新宿区市ヶ谷砂土原町3-17-1-1-303

(72) 発明者 陶 志福

東京都江東区森下4-17-13-502

(72) 発明者 斎藤 烈

京都府京都市山科区勧修寺柴山1-21

(74) 代理人 100102668

弁理士 佐伯 憲生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2本鎖DNAを切断できる化合物及びその使用方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は2本鎖DNAを同時にアルキル化し、切断し得る新規な化学種を提供するものであり、さらにこれらの化学種を用いたDNAのアルキル化および切断方法を提供するものである。また、本発明はこれらの化合物を用いた抗癌剤を提供するものである。

【解決手段】 本発明は、一般式 (I)

B-L-A (I)

(式中、BはDNAの塩基配列を認識できる化学構造、例えば置換基を有してもよいピロール-イミダゾールボリアミドを示し、AはDNAの塩基の一種に結合し得る化学構造、例えばデュオカルマイシンAのアルキル化部分を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカー、例えばビニル基を示す。) で表されるDNAの2本鎖を同時にアルキル化し切断することができる化合物、これらの化合物を用いたDNAのアルキル化方法、2本鎖DNAの切断方法、及び、これらの化合物を用いた医薬組成物に関する。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式 (I)



(式中、BはDNAの塩基配列を認識できる化学構造を示し、AはDNAの塩基の一種に結合し得る化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。) で表されるDNAの2本鎖を同時に切断することができる化合物。

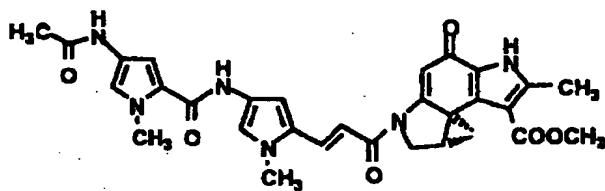
【請求項2】 DNAの塩基配列を認識できる化学構造が、置換基を有してもよいピロール及び／又はイミダゾールから誘導される化学構造である請求項1に記載の化合物。

【請求項3】 DNAの塩基の一種に結合し得る化学構造が、シクロプロパン環を有する化学構造である請求項1又は2に記載の化合物。

【請求項4】 A及びBの化学構造を結合させ得るリンカーが、ビニル基を含有する化学構造である請求項1～3のいずれかに記載の化合物。

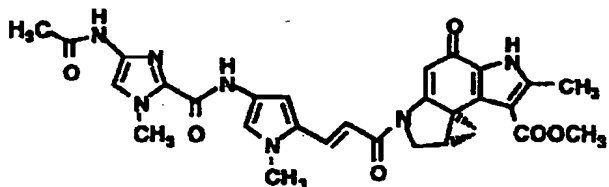
【請求項5】 一般式 (I) で表される化合物が次式

【化1】



又は

【化2】



で表される化合物である請求項1～4のいずれかに記載の化合物。

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載の化合物を用いて、2本鎖DNAの特定の塩基配列部分をアルキル化する方法。

【請求項7】 請求項1～5のいずれかに記載の化合物を用いて、2本鎖DNAの特定の塩基配列部分を切断する方法。

【請求項8】 特定の塩基配列が、TGACG若しくはCGACG又はそれらの相補鎖である請求項6又は7に記載の方法。

【請求項9】 請求項1から5のいずれかに記載の化合物及び製薬上許容される担体からなる医薬組成物。

【請求項10】 癌の治療薬である請求項9に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、化学合成により製造し得る化合物を用いて2本鎖DNAを同時にアルキル化し、切断し得る化合物、これらの化合物を用いたDNAのアルキル化方法、2本鎖DNAの切断方法、及び、これらの化合物を用いた医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 ヒトゲノムプロジェクトにより我々の「生命の設計図」である全遺伝子の塩基配列が数年内に解明されようとしている。この設計図に傷があったり、後天的に傷がはいると、病気や老化を引き起こすことが知られている。ヒトゲノムプロジェクトの進展により癌を含む多くの疾病はDNAレベル理解されるようになり、診断、予防などを中心とした医学全体が、革新的に変化するものと考えられる。さらに、これらの疾病のDNAレベルでの理解に基づいた治療法、すなわち病因遺伝子やその産物をターゲットとした医薬品の開発への期待も大きい。基礎研究を臨床研究に生かしてゆくための橋渡しの研究はまだ、途についたばかりである。現在、用いられている抗癌剤は、スクリーニングによって選択された抗生物質が多く、もともと癌細胞を殺すために微生物が産生したものではなく、癌の分子生物学的知見に基づいたものはほとんどない。細胞内の特定遺伝子の発現を細胞外から自由自在にコントロールすることが可能になれば、究極の遺伝子レベルでの治療法となると考えられる。

【0003】 本発明者らは、最近抗生物質デュオカルマイシンがディスタマイシンなどの他種分子とヘテロダイマーを形成し協同的にDNAの分子認識を行ない、デュオカルマイシン単独の場合とは異なる塩基配列を効率よくアルキル化することを発見した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14405, 1996)。この結果をもとにデュオカルマイシンのアルキル化部分にDNA認識部位としてピロール-イミダゾールボリアミドを結合させ、任意の塩基配列でDNAを選択的にアルキル化する分子の合成に成功し、特許出願をした (特願平10-260710号)。

【0004】 しかし、デュオカルマイシンのアルキル化部分にDNA認識部位としてピロール-イミダゾールボリアミドを結合させだけの化合物ではアルキル化能が十分なだけではなく、これらの化合物は1本鎖の塩基配列しか認識できないものであった。そこで、本発明者らは、これらの化合物の分子動力学などのコンピュータモデリングを用いてこれらの分子とDNAとのアルキル化を詳細に検討すると、デュオカルマイシンの反応性のあるシクロプロパン部分 (セグメントA) にビニル基などのリンカーを導入することにより、DNAに対するアルキル化能が増すことが期待できそうであることが判明した。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、アルキル化能が増大したDNAのアルキル化剤を提供するものである。さらに、本発明者らは、この研究において本発明のアルキル化剤がダイマー様の挙動をとり、2本鎖DNAを同時にアルキル化し切断することを見出し、特定の塩基配列に対して人工の制限酵素としての作用を有するものであることを見出した。したがって、本発明は2本鎖DNAを同時にアルキル化し、切断し得る新規な化学種を提供するものであり、さらにこれらの化学種を用いたDNAのアルキル化および切断方法を提供するものである。また、本発明はこれらの化合物を用いた抗癌剤を提供するものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、一般式 (I) B-L-A (I)

(式中、BはDNAの塩基配列を認識できる化学構造を示し、AはDNAの塩基の一種に結合し得る化学構造を示し、LはA及びBの化学構造を結合させ得るリンカーを示す。) で表されるDNAの2本鎖を同時に切断することができる化合物に関する。また、本発明は、前記の化合物を用いた2本鎖DNAの特定の塩基配列部分をアルキル化する方法、及び2本鎖DNAの特定の塩基配列部分を切断する方法に関する。さらに、本発明はこれらの化合物を用いた医薬組成物、特に抗癌剤に関する。

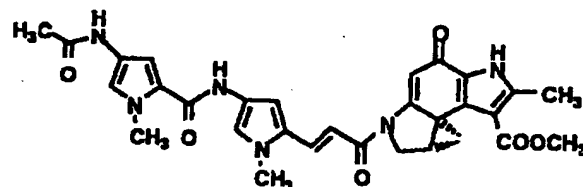
【0007】本発明の前記一般式 (I) における、DNAの塩基配列を認識できる化学構造部分であるBは、置換基を有してもよいピロール及び／又はイミダゾールから誘導される化学構造が好ましい。ピロールやイミダゾールの置換基としては、DNAの塩基配列を認識する妨げとならないものであれば特に制限はなく、例えば、炭素数1~10、好ましくは1~5の直鎖又は分枝状のアルキル基、前記したアルキル基から誘導されるアルコキシ基、水酸基、アミノ基、前記したアルキル基から誘導されるN-アルキル置換アミノ基、有機カルボン酸から誘導されるN-アシルアミノ基、グアニジノ基、置換グアニジノ基などが挙げられる。例えば、N-メチルピロール、N-メチルイミダゾール、3-ヒドロキシピロール、N-メチル-3-ヒドロキシピロールなどが挙げられる。また、DNAの塩基配列を認識できる化学構造部分であるBとしては、より具体的にはピロール-イミダゾールポリアミド結合が好ましい。ピロールやイミダゾールの長さ(個数)は特に制限はないが2~10個、好

ましくは2~5個程度である。

【0008】DNAの塩基の一種に結合し得る化学構造部分であるAとしては、シクロプロパン環を有する化学構造が好ましく、デュオカルマイシンのアルキル化部分がより好ましい。A及びBの化学構造を結合させ得るリンカー部分Lとしては、セグメントAとセグメントBとを適当な距離隔てることができ、かつ、アルキル化活性を失活させないものが好ましい。好ましい具体例としてはビニル基を含有する化学構造が挙げられる。

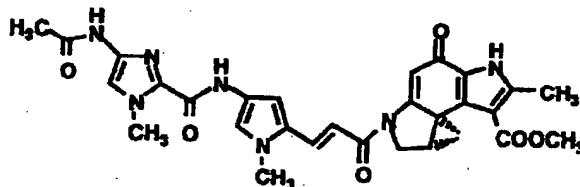
【0009】一般式 (I) で表される本発明の化合物の好ましいものとしては、次式

【化3】



で表される化合物(以下、「PyPyLDu86」という。)、又は

【化4】

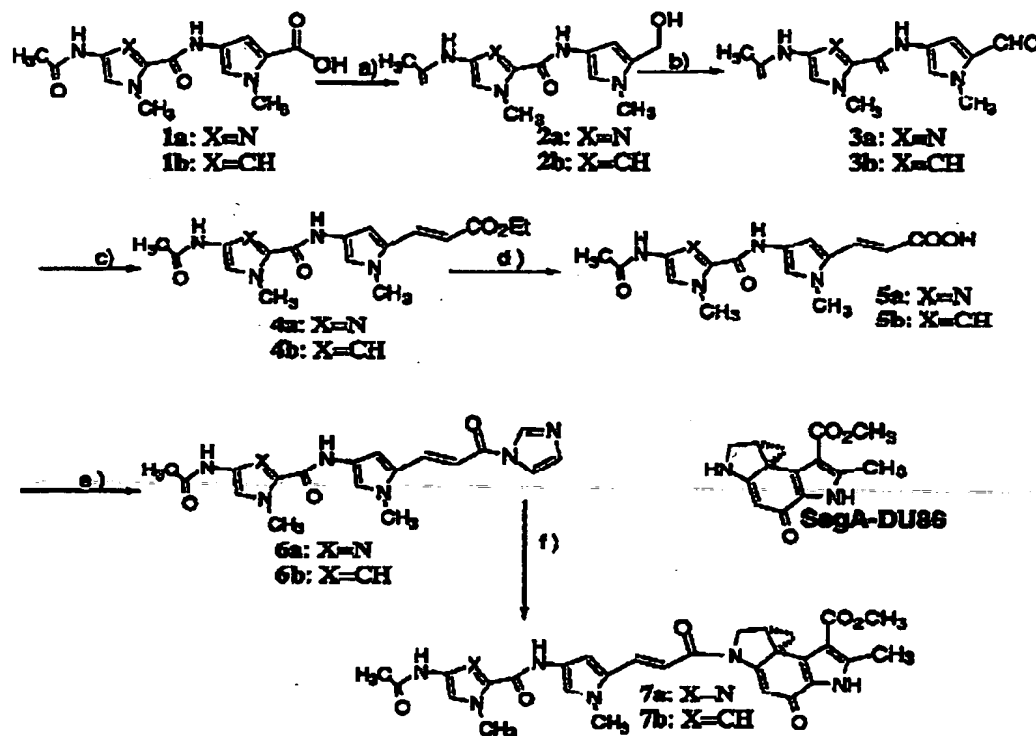


で表される化合物(以下、「ImPyLDu86」という。)が挙げられる。前記した化合物は、塩基配列TGACG若しくはCGACG又はそれらの相補鎖を認識する。

【0010】本発明の一般式 (I) で表される化合物は、公知の方法に準じて製造することができる。即ち、Aセグメント及びBセグメントを常法により製造し、これに順次リンカーセグメントLを結合させ、次いで残りのセグメントを結合させることにより製造することができる。

【0011】例えば、前記のImPyLDu86 (7a) 及びPyPyLDu86 (7b) の製造例を次の化学反応式で示す。反応式中の各化合物の下に数字は化合物の番号を示す。

【化5】



反応式中の a) はベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (BOP) の THF 溶液中での処理、次いで NaBH_4 処理を示し、b) は THF 中での MnO_2 処理を示し、c) は THF 中でのトリエチルホスホアセテート及び NaH 処理を示し、d) は水-メタノール中での水酸化ナトリウムによる処理を示し、e) は DMF 中での 1, 1-カルボニルジイミダゾールでの処理を示し、f) は DMF 中での水素化ナトリウムを用いた DU86 のセグメント A との処理を示す。

【0012】 こうして合成された PyPyLDu86 および、ImPyLDu86 の DNA との反応性を調べた。ImPyLDu86 によるアルキル化の結果を図 1 に示した。この実験に用いた DNA 及び使用した ImPyLDu86 を図 2 に示す。

【0013】 右側の泳動図は 2 本鎖 DNA の上のストランドの結果、中央の泳動図は下のストランドの結果である。アルキル化の位置は加熱により切断バンドとしてみることができる。その結果低濃度から主に 2 本鎖 DNA はサイト 1 とサイト 2 で 2 本鎖の切断されていることがわかり、アルキル化が 2 本鎖で同時に起っていることが判断できる。このような切断を引き起こす化合物はこれまでに例がなく、まさに人工の制限酵素ということが出来る。また用いた ImPyLDu86 の量から 70 % の高率で切断が起っていることが判明し、以前に合成した分子 (特願平 10-260710 号参照) にくらべて非常に高い効率であることがわかる。

【0014】 2 本鎖で同時にアルキル化が起った原因

は、図 3 に示すように、ImPyLDu86 が 2 量体を形成しリンカー部分とイミダゾールがよいスタッキングをすることにより GC 塩基対を認識して、このものが 2 本鎖 DNA の認識配列に特異的に結合しておきているものと考えられる。これらの結果、分子設計により提案され導入したりんカーは反応性も向上させ、またイミダゾールとのペアによる認識ユニットとしても利用できることが明らかになった。これらの知見に基づいて DNA の特定配列をターゲットとする新しいタイプの遺伝子治療薬の分子設計に一步近づいたと言える。

【0015】 次に、本発明の化合物の前記した性質に基づく抗細胞活性を検討した。即ち、本発明の PyPyLDu86、ImPyLDu86 と、抗癌剤として公知のデュオカルマイシン A について HeLa S₃ 細胞 (子宮頸部扁平上皮癌細胞) の抗細胞活性を試験した。結果を表 1 に示す。この結果、本発明の化合物はデュオカルマイシン A に比べて約 3 ~ 7 倍の活性があることがわかった。

【0016】 本発明の化合物は抗癌剤として有用であり、製薬上許容される医薬担体と共に医薬組成物とすることができる。本発明の医薬組成物は、経口投与又は非経口投与により症状に応じて投与することができる。本発明の医薬組成物の有効投与量は、患者の状態や症状などにもよるが、通常は $1 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ の範囲で適宜選択することができる。また、本発明の医薬組成物は通常の方法により、注射剤などに製剤化することができる。

【0017】

【実施例】次に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0018】以下の実施例において使用される試薬の略称は次のとおりである。

DIEA: N, N-ジイソプロピルエチルアミン、

DMF: N, N-ジメチルホルムアミド、

THF: テトラヒドロフラン、

BOP: ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート。

【0019】以下の実施例においては、反応の進行を0.25mmシリカゲル60プレートを用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) で254nmの蛍光インジケーター (メルク社製) によって追跡した。TLCプレートはUVによって観察した。NMRスペクトルは、テトラメチルシランを内部標準とし、 ^1H -NMRスペクトルの化学シフトはppmで表記した。EI (Electron impact) マススペクトルは、JNM-AX505を用い、ESIMS (Electrospray ionization mass spectra) は、PE SCIEX API 165を用いて測定した。Ex Taq DNA ポリメラーゼとフィルターチューブ (Suprec-02) は、宝酒造から、thermo sequenase core sequencing kitとローディング色素 (フューシンレッドのDMF溶液) はアマシャム社から、5' エンドテキサスレッド修飾DNAオリゴマー (18mer) はクラボウから、50%ロングレンジャー (登録商標) ゲル溶液はFMCバイオプロダクト社からそれぞれ購入した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動はHITACHI 5500-S DNasequencerを用いて行った。

【0020】実施例1 (化合物2a (X=N) の製造) THF30ml中に化合物1a 204.8mg (0.67mmol)、BOP326.3mg (0.74mmol) 170ml、 NaBH_4 98mg (2.59mmol) を加えた。この反応溶液を室温下で3時間反応させた後、溶媒を減圧留去して得られた残さに CH_3OH 20mlと水5mlを加えた。この溶液を1時間40 攪拌し、透明な溶液を得た。減圧下で溶媒を留去し、黄色の残渣を CH_3OH と CH_2Cl_2 を用いたフラッシュクロマトグラフィーにより精製して収量92.6mgの目的の化合物2aを収率47.4%で得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ

10.24 (s, 1H), 9.62 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.10 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.09 (d, J=2.0Hz, 1H), 4.86 (t, J=5.5Hz, 1H), 4.34 (d, J=5.5Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 2.01 (s, 3H)。

【0021】実施例2 (化合物2b (X=CH) の製 50

造)

化合物2bは化合物2aと同様の方法で収率68.5%で得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ

9.76 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 7.10 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.05 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.78 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.01 (d, J=2.0Hz, 1H), 4.82 (t, J=5.5Hz, 1H), 4.34 (d, J=5.5Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 1.96 (s, 3H)。

【0022】実施例3 (化合物3a (X=N) の製造)

THF30ml中に化合物2a 85mg (0.29mmol)、活性化された MnO_2 (85%) 550mgを加え、室温下で1.5時間攪拌した後、ろ過した。溶媒を減圧留去して得られた残渣を ^1H NMRを測定し、次の反応に直接使うのに十分な純度であり、さらに精製する必要がないことを確認した。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ

10.21 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.10 (d, J=2.0Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.02 (s, 3H)。

【0023】実施例4 (化合物3b (X=CH) の製造)

化合物3bは化合物3aと同様の方法で得られた。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ

9.99 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.14 (d, J=1.0Hz, 1H), 6.98 (d, J=1.0Hz, 1H), 6.88 (d, J=2.0Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 1.97 (s, 3H)。

【0024】実施例5 (化合物4a (X=N) の製造)

氷冷下で、THF6mlに NaH (60%) 23.1mg (0.58mmol) を溶解させ、さらにトリエチルホスホノアセテート116mlを加えた。この反応溶液を5分間攪拌した後、THF25mlに溶解した化合物3aを加え、終夜反応させた。THFを減圧留去し、得られた残渣から酢酸エチルを用いたフラッシュクロマトグラフィーにより収量88.5mgの黄色の固体の化合物4aを収率84%で得た。(化合物2aからの2段階での収率)。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ

10.25 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 7.51 (d, J=15.9Hz, 1H), 7.44 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.84 (d, J=1.8Hz, 1H), 6.11 (d, J=15.9Hz, 1H), 4.16 (q, J=7.0Hz, 2H), 4.13 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.24 (t, J=7.0Hz, 3H)。

【0025】実施例6 (化合物4b (X=CH) の製造)

化合物4bは化合物4aと同様の方法で収率55%で得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ

9.87 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 7.51 (d, J=15.5Hz, 1

H), 7.39 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.13 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.85 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.73 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.07 (d, J=15.5Hz, 1H), 4.16 (q, J=7.0Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.23 (t, J=7.0Hz, 3H).

【0026】実施例7 (化合物5a (X=N) の製造)
CH₃OH 5ml中に化合物4a 70mg (0.2mmol)、2N稀NaOH 1.5mlと水3mlを加えた反応溶液を室温下で4.5時間撹拌した。溶媒

ESIMS m/e C₁₅H₁₆N₅O₄として; 計算値 (M-H) 330.3

実測値 330.2

【0027】実施例8 (化合物5b (X=CH) の製造)
化合物5bは化合物5aと同様の方法で収率57%で得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ

ESIMS m/e C₁₅H₁₇N₄O₄として; 計算値 (M-H) 329.3

実測値 329.4

【0028】実施例9 (化合物6a (X=N) の製造)
DMF 2ml中に化合物5a 26.4mg (0.08mmol)、1, 1'-カルボキシルジイミダゾール49.9mg (0.31mmol)を加えた。この反応溶液を室温下で終夜撹拌した後、水20mlを加え、ろ過して黄色の沈殿物として化合物6aを収量20.5mg 収率68%で得た。

ESIMS m/e C₁₅H₁₈N₇O₃として; 計算値 (M-H) 380.4

実測値 380.4

【0029】実施例10 (化合物6b (X=CH) の製造)
化合物6bは化合物6aと同様の方法で収率80%で得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ

10.1 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 7.91 (t,

ESIMS m/e C₁₅H₁₉N₆O₃として; 計算値 (M-H) 379.4

実測値 379.4

【0030】実施例11 (化合物7a (X=N) の製造)
-50℃においてDMF 0.3ml中に水素化ナトリウム (60%) 3.2mg (0.08mmol)を溶解させた溶液を、DMF 0.3mlにDU86のセグメント A 6.1mg (0.024mmol)を溶解させた溶液を加えた。この反応溶液を-50~-40℃下で3時間撹拌した後にDMF 1mlに化合物6a 10.8mg (0.028mmol)を溶解させた溶液を-50℃下で加えて、更に-40℃下で5時間撹拌した後、-30℃に保つ冷凍庫で2日間置いた。その後、リン酸ナトリウム緩衝液 (0.01M) 3mlを加えて、室温下で5

ESIMS m/e C₂₂H₂₈N₇O₆として; 計算値 (M-H) 570.6

実測値 570.4

【0031】実施例12 (化合物7b (X=CH) の製造)

を減圧留去により除去した後、水20mlを加えた。この溶液をろ過し、ろ液を2N HClによりpH2~3にした。これにより得られたゲル状の沈殿物をろ過し、収量43mgで化合物5aを収率67%で得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ

10.24 (s, 1H), 9.84 (s, 1H), 7.43 (d, J=15.0Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.03 (d, J=15.0Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.86 (s, 3H);

計算値 (M-H) 330.3

実測値 330.2

9.83 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 7.38 (d, J=16.0Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.13 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.84 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.99 (d, J=16.0Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 1.99 (s, 3H);

¹H NMR (DMSO-d₆) δ

10.23 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.90 (d, J=1.0Hz, 1H), 7.88 (d, J=15.5Hz, 1H), 7.50 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.32 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.16 (d, J=15.5Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 2.03 (s, 3H);

J=2.0 and 2.0Hz, 1H), 7.87 (d, J=15.0Hz, 1H), 7.48 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.22 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.16 (d, J=1.5Hz, 1H), 7.14 (d, J=15.0Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.89 (d, J=1.5Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 1.97 (s, 3H);

分間撹拌した。溶媒を減圧留去して得られた黄色の残さをCH₃OHとCHCl₃を用いたフラッシュクロマトグラフィーにより精製して収量12.3mgの化合物7aを収率91%で得た。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ

12.36 (s, 1H), 10.24 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 7.58 (d, J=15.0Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.41 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.99 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.58 (d, J=15.0Hz, 1H), 4.29 (d, J=10.5Hz, 1H), 4.19 (dd, J=5.0Hz and 4.5Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.46 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.08 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.29 (t, J=4.5 and 3.5Hz, 1H);

化合物7bは化合物7aと同様の方法で収率77%で得た。

^1H NMR (DMSO- d_6) δ
12.36 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 7.57 (d, J=15.0Hz, 1H), 7.38 (d, J=1.5Hz, 1H), 7.14 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.88 (d, J=1.5Hz, 1H), 6.86 (d, J=2.0H

z, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.56 (d, J=15.0Hz, 1H), 4.29 (d, J=10.5Hz, 1H), 4.19 (dd, J=4.0 and 4.5Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.73 (s, 1H), 3.71 (s, 1H), 3.46 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.09 (m, 1H), 1.97 (s, 3H), 1.29 (t, J=4.5 and 3.5Hz, 1H);

ESIMS m/e $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_6$ として; 計算値 (M-H) 569.6

実測値 569.5

【0032】実施例13 (450bpのDNAフラグメントのアルキル化)

(1) 5'-テキサスレッド-末端修飾450塩基対DNAフラグメントの合成。

5'-テキサスレッド-末端修飾450bp DNAフラグメント pUC18F780*-1229と pUC18R1459*-1908 (これらは相補的配列) は、5'-末端テキサスレッド修飾18mersをプライマーとして用いたPCR法により製造され、Suprec-02によって精製された。これらの濃度はエチデュムブロマイド染色法によって決定された。アスタリスクはテキサスレッド修飾位置を示し、数字は複製開始点からのヌクレオチド番号を示している。この塩基配列を配列表の配列番号1及び2に示す。

(2) 高分解能ポリアクリルアミドゲル電気泳動。
全量10 μ lのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 12.5mM中に5'末端がテキサスレッドでラベルされたDNAフラグメント60nM、DMF5% (v/v) とさまざまな濃度の薬剤を含む標準反応溶液を微量遠心分離管 (Eppendorf) に入れて室温で一晩温置した後、calf thymus DNA (5mM, 1 μ l) を加えて90℃5分間加熱した。DNAはエタノール沈殿により得られた。得られたDNAはローディング色素 (フューシンレッドのDMF溶液) 8 μ lに溶解させた。サンプル溶液はDNAを変性させるため、94℃20分温置した後、すぐに0℃に冷却した。2 μ lについて、5500-SDNA sequencer systemを用いた、6% ロングレンジャー (登録商標) を用い、ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動にかけられた。

【0033】実施例14 (HeLaS₃細胞生育阻害試験)

24穴カルチャープレートの各ウェルに10%牛胎児血清および2mMグルタミンを含むMEM培地で2.67 $\times 10^4$ 個/mlに調整したHeLaS₃細胞を0.75mlずつ分注した。炭酸ガスインキュベーター内で一晩37℃で培養後、培地により適宜希釈した表1に示す各試験化合物を0.25mlずつ各ウェルに加えた。炭酸ガスインキュベーター内で細胞を72時間培養後、培養上清を除去し、トリプシン・エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液で細胞を分散、回収した。セルカウンターで細胞数を測定し、無処理での細胞数と既知濃度の試験化合物で処理した場合の細胞数を比較することにより、細胞の増殖を50%阻害する試験化合物の濃度 (IC₅₀) を算出した。その結果を下表に示す。

【0034】

【表1】

試験化合物	IC ₅₀ (nM)
PyPyLDu86	1.5
ImPyLDu86	0.7
デュオカルマイシンA	4.7

【0035】

【発明の効果】本発明は、2本鎖のDNAを同時にアルキル化又は切断することができる合成可能な化合物を提供するものであり、人工の制限酵素として有用なばかりでなく、特定の塩基配列をターゲットとして遺伝子治療において有用なものである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation
<120> Compound to cleavage double-stranded DNA and their use
<130> PA908444
<160> 2
<210> 1
<211> 450
<212> DNA
<213> pUC 18
<400> 1
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gigagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 60
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca 120

13
 caaaaatcga cgcicaagtc agaggiggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 180
 gtccccccct ggaagctccc tcgtgcgttc tccgttccg accctgccgc ttaccggata 240
 cctgtccgcc ttctcccttc cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta 300
 tctcagttcg gtgtaggtcg ttgcctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgtica 360
 gcccgaccgc tgcgccttat ccggttaacta tcgtctttag tccaacccgg taagacacga 420
 cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa 450

<210> 2
 <211> 450
 <212> DNA
 <213> pUC 18
 <400> 2

tcctagtcctt ctatggcgtc cttcttgta cactcgtttt ccggctgttt tccggctcctt 60
 ggcatctttc cggcgcaacg accgcaaaaa ggtaiccgag gcggggggac tgcctgtagt 120
 gtctttagct gcgagttcag tctccaccgc ttgggctgt ccigatatit ctatggctccg 180
 caaaggggga ccttcgaggg agcacgcgag aggacaaggc tgggacggcg aatggcciat 240
 ggacaggcgg aaagagggaa gcccttagca ccgcgaaaga gttacgagtg cgacatccat 300
 agacicaagc cacatccagc aagcgagggt cgacccgaca cactgtcttg gggggcaagt 360
 cgggctggcg acgcggaata ggccattgat agcagaacac aggttgggcc attctgtgct 420
 gaatagcgtt gaccgtcgtc ggtgaccatt 450

【図面の簡単な説明】

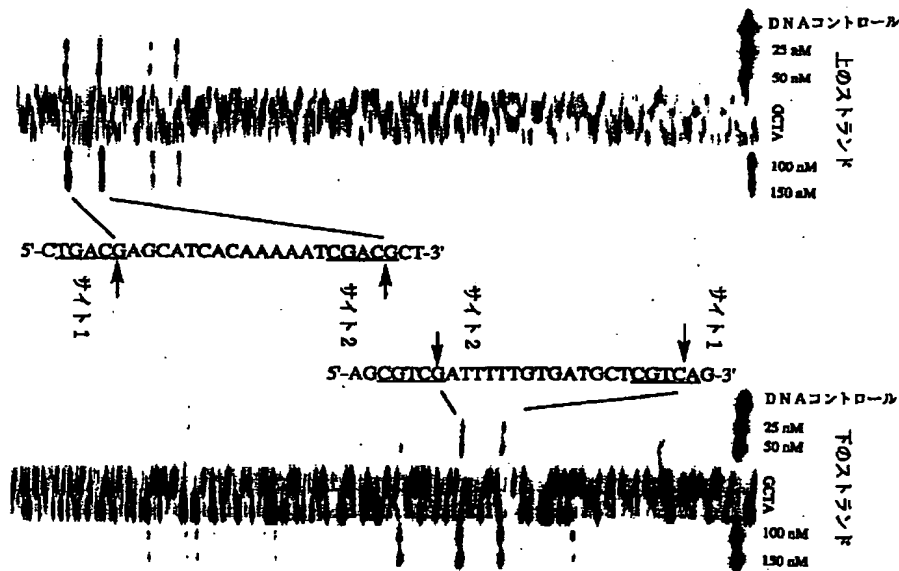
【図 1】 図 1 は、本発明の ImPyLDu 86 と DNA との反応の結果を示した、図面に代わる写真である。

【図 2】 図 2 は、実験に使用した DNA の塩基配列及び

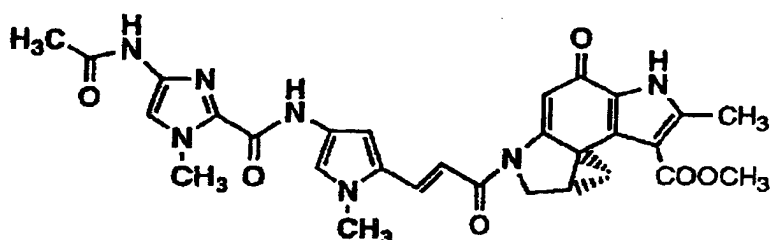
ImPyLDu 86 の化学構造を示したものである。

【図 3】 図 3 は、本発明の化合物による DNA の切断サイトを模式的に示したものである。

【図 1】



【図2】



5'- AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA
 3'- TCTTAGTCCC CTATTGCGTC CTTTCTTGTA CACTCGTTTT CCGTCTGTTT

AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC
 TCCGGTCCTT GGCATTTTTTC CGGCGCAACG ACCGCAAAAA GGTATCCGAG

Site 1 ↓ Site 2 ↓
 CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG
 GCGGGGGGAC TGCTCGTAGT GTTTTTAGCT GCGAGTTCAG TCTCCACCGC

AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC
 TTTGGGCTGT CCTGATATTT CTATGGTCCG CAAAGGGGGA CCTTCGAGGG

TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC
 AGCACGCGAG AGGACAAGGC TGGGACGGCG AATGGCCTAT GGACAGGCGG

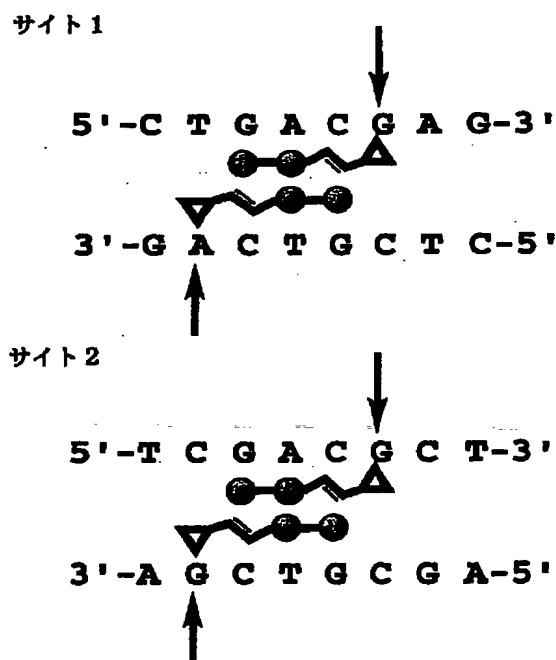
TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GCGGCTTTCT CAATGCTCAC GCTGTAGGTA
 AAAGAGGGAA GCCCTTAGCA CCGCGAAAGA GTTACGAGTG CGACATCCAT

TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC
 AGACTCAAGC CACATCCAGC AAGCGAGGTT CGACCCGACA CACGTGCTTG

CCCCCGTTCA GCCCCACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACTA TCGTCTTGAG
 GGGGGCAAGT CGGGCTGGCG ACGCGGAATA GGCCATTGAT AGCAGAACTC

TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA-3'
 AGGTTGGGCC ATTCTGTGCT GAATAGCGGT GACCGTCGTC GGTGACCATT-5'

【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成12年5月9日(2000. 5. 9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正内容】

【0013】 左側の泳動図は2本鎖DNAの上のストランドの結果、右側の泳動図は下のストランドの結果である。アルキル化の位置は加熱により切断バンドとして

みることができる。その結果低濃度から主に2本鎖DNAはサイト1とサイト2で2本鎖の切断されていることがわかり、アルキル化が2本鎖で同時に起っていることが判断できる。このような切断を引き起こす化合物はこれまでに例がなく、まさに人工の制限酵素といえることができる。また用いたImPyLDu86の量から70%の高率で切断が起っていることが判明し、以前に合成した分子(特願平10-260710号参照)にくらべて非常に高い効率であることがわかる。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 HA09 HA11
 HA20
 4C050 AA01 AA07 AA08 BB04 CC04
 EE02 FF02 FF03 GG03 HH04
 4C086 AA01 AA02 AA03 CB03 MA01
 MA02 MA04 MA05 NA14 ZB21
 ZB26 ZC41

THIS PAGE BLANK (USPTO)